



(19)

(11) Publication number:

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number: 10120045

(51) Intl. Cl.: G01N 33/53 C12P 21/08 G01N 33/

(22) Application date: 13.04.98

(30) Priority: (43) Date of application publication: 29.10.99 (84) Designated contracting states:	(71) Applicant: TEIKOKU SEIYAKU CO LT (72) Inventor: TANAKA HIROYUKI FUKUDA NORIKO SEN TOSHIE MASAYAMA YUKIHIRO (74) Representative:
---	---

**(54) METHOD FOR IMMUNE
DYEING OF MAIN COMPONENT
GINSENOCIDES OF MEDICINAL
GINSENG**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To implement a method for dyeing ginsenoside Rb1.

SOLUTION: Through the use of a monoclonal antibody (MAb) to ginsenoside (Rb1 (GRb1), which is the main component of medicinal ginseng, ginsenosides expanded on a thin layer chromatograph(TLC) are transferred to a polyvinylidene difluoride(PVDF) film, and ring cleavage is performed on sugar sections of the ginsenosides by sodium periodate to form protein and a conjugated body. Adsorption to the film is performed by this operation, an antigen- antibody reaction is performed by anti-GRb1MAb, a peroxide-labeled secondary antibody is added, and hydrogen peroxide and a matrix are added to cause the ginsenosides to develop colors. On the other hand, a section of the organ of medicinal ginseng is coated with a PVDF film, ginsenosides are transferred to the film, the film is treated by procedures similarly with TLC to cause the ginsenosides to develop colors.

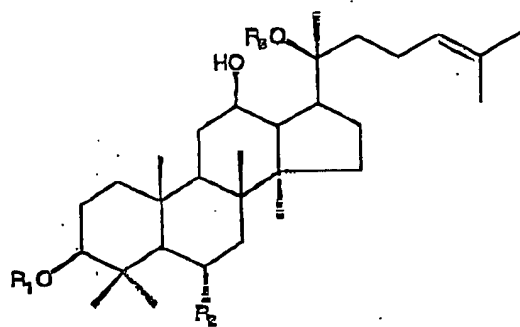
COPYRIGHT: (C)1999,JPO

BEST AVAILABLE COPY

(4)

特開平11-295310

ジンセノサイド類



	R1	R2	R3
Rb1	Glc ² -Glc-	H	Glc ⁶ -Glc-
Rc	Glc ¹ -Glc-	H	Ara(0 ⁶)-Glc-
Rd	Glc ² -Glc-	H	Glc-
Re	H	Rha ² -Glc-O-	Glc-
Rg1	H	Glc-O-	Glc-

【0010】実施例2 人参器官の抗体染色

人参の根の部分縦および横に切断する。直ちにPVD F膜を被い、5時間放置する。膜を洗浄後、上記の方法で抗体染色する。図2にこれらの抗体染色を示す。内皮部分にジンセノサイド含有量が高く、内部の髄部分には含有量が少ないことがわかる。また、髄線に沿って放射状に分布していることが明確にわかる。人参の根を縦割に、上記と同様にして抗体染色したのが図3である。この染色からも内皮部分に多く、中心部には少ないことがよくわかる。これらの抗体染色からジンセノサイドを効率良く抽出単離するためには濃く染色した部分を分離し、原料とすることが好ましい。

【0011】参考例 抗GR1MAbの製造

抗GRb1MAb産生ハイブリドーマの製造

(1) 抗原の調整: GRb1(10mg)を80%メタノール0.7mlに溶かした溶液を、4mgの過ヨウ素酸ナトリウムを水0.5mlに溶かした溶液に攪拌しながら添加する。1時間反応後、BSAを溶かした炭酸塩バッファーを上記反応液に添加して、5時間攪拌反応する。反応後透析して17mgのGRb1-BSA抱合体を得た。GRb1-HSA抱合体も同様に得た。

(2) 免疫脾臓細胞の調整: GRb1-BSA抱合体5

0μgをフロイント-コンブリート-アジュバントに乳濁化させ、BALB/C系マウスの腹腔内に投与した。以後、2週間の間隔で50μgのGRb1-BSA抱合体アジュバント溶液を2回同様に投与し、最後にGRb1-BSA抱合体のみを100μg投与し免疫を完了した。3日後にマウスを麻酔下屠殺し、脾臓を摘出した。脾臓を細断した後、100メッシュのナイロン網でろ過し、脾臓の単離細胞を得た。

【0012】(3) ハイブリドーマの調整: 単離した免疫脾臓細胞に低張液(155mM塩化アンモニウム)を加えて赤血球を溶血した後、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)で細胞を3回洗う。マウスミエロマ細胞もIMDMで3回洗浄した。両細胞数を計測し脾臓細胞と骨髓腫細胞を10:1の割合として遠心する。上清を捨て、沈殿した細胞を充分解きほぐし、ポリエチレングリコール(PEG)4000を培地で希釈した45%液を0.5ml滴下して融合を行った。37℃、30秒間静置した後、IMDM1mlを1分間かけて添加した。引き続き10mlを5分間かけて添加した。1,000rpmで10分間遠心した。沈殿を10%FeS添加IMDMにより洗い、遠心して上清を捨てた。ヒポキサンチン 10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} Mお

BEST AVAILABLE COPY